

令和元年6月14日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11781

研究課題名(和文) GPCR転写ネットワーク制御と骨再生を目指したRNA核酸医療への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to the RNA nucleotide medicine using the mechanism of GPCR network pathway for bone regeneration.

研究代表者

渡 一平 (WATARI, Ippei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：10431941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス前骨芽細胞MC3T3-E1を培養した後、次世代シーケンサーを用いてRNA seqを行い(paired-end, read長：4000万)、得られたデータからFPKM値を算出、既知および未知遺伝子と転写産物についてそれぞれ検討を行った。同定された遺伝子は約32000個で、GPCRクラスBアゴニストであるGLP-1添加で発現量が2倍以上に上昇した遺伝子は約4000個で、そのうち未知遺伝子は約1000個であった。一方、同定された転写産物は約70000個で、GLP-1添加で発現量が2倍以上に上昇した転写産物は約19000個で、機能未知新規の転写産物は約9000個であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題に結果、先行研究では報告されていない数多くの機能未知遺伝子や転写産物が骨再生に関与する可能性が示された。今後、これらの中からより新規骨再生医療の標的となる遺伝子・転写産物を絞って、効果の高い新規骨再生療法が開発されることが望まれる。

研究成果の概要(英文)：Concerning MC3T3-E1 cell, RNA seq is performed using a next-generation sequencer (paired-end, read length: 40,000,000), and FPKM values were calculated, with known and unknown genes and transcript products.

Approximately 32000 genes were identified, and 4,000 genes whose expression level was increased more than twice by administration of the GLP-1. 1,000 genes were detected whose function were unknown.

On the other hand, the number of transcripts identified was about 70,000, the transcripts whose expression level increased by 2 times or more by administration of GLP-1 was about 19,000, and the transcript whose novel function was unknown was about 9,000.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：RNAシーケンス 骨芽細胞 GPCR 骨再生 新規遺伝子・転写産物 転写ネットワーク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天異常、外傷、歯周病、腫瘍摘出時の顎骨切除などに伴って欠損した顎骨・歯槽骨の再生には、様々な方法が試みられているが、現時点では、骨形成促進因子を外来性に投与あるいは発現させ、骨形成を促すものがほとんどである。しかしこの場合、外来物の投与による副作用や強制発現させた因子による持続的な影響が無視できないことが多く、臨床応用に際して障壁となることが多い。そこで応募者は、内因性の骨形成抑制因子のネットワークに着目し、最新の RNA 工学を応用して、限られた時間内で副作用なく効率的に顎骨・歯槽骨を再生する方法を探ることを目的として本研究を行った。

2. 研究の目的

7 回膜貫通型受容体である G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) には 6 つのファミリーが存在し、ロドプシン型の GPCR クラス A (GPCR-A) には血管の石灰化に関わるプリン受容体が存在し、セクレチン型の GPCR クラス B (GPCR-B) には PTH に代表される骨代謝制御に関わる受容体が数多く存在している。現在、各種疾患治療薬の標的受容体として最も研究が展開されている『GPCR を介した安全かつ有効な新規骨再生治療法の開発』を研究の全体構想として掲げ、『骨芽細胞に存在する GPCR の発現調節機構を解明し、唾液腺を標的臓器として、骨形成に対して抑制的に作用する GPCR 遺伝子をターゲットに最新の RNA 工学 (次世代シーケンサーとバイオインフォマティクスツールの活用) を用いた骨再生核酸医療を探索する』ことが本研究の具体的な目標である。

3. 研究の方法

本研究では、GPCR クラス B 受容体のアゴニストであり、上部消化管から分泌され膵臓に働いてインスリン分泌促進作用を持つ GLP-1 が骨芽細胞に与える影響を詳細に検討する目的で、網羅的な発現遺伝子/転写解析を行った。マウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 を標準 α MEM 培地、100 ng/ml BMP-2 添加培地および 100 nM GLP-1 添加培地にて 72 時間培養した後、RNA を抽出し、次世代シーケンサー (Hi Seq 2500, Illumina 社) を用いて RNA seq を行った。シーケンス (paired-end、read 長: 4000 万) の結果から、各サンプルの発現量 FPKM (Fragments per kilo base of exon model per million mapped reads) 値を算出し、既知および未知遺伝子と転写産物についてそれぞれ発現量の比較検討を行った。本解析には ToPHat、Bowtie2 および Genedata Expressionist を用いた。また、David を用いてヒートマップを作成し、KEGG パスウェイ解析も行い、カルシウムシグナリングと II 型糖尿病に着目して、GLP-1 投与後に発現量が上昇した遺伝子についてパスウェイ解析を行った。

4. 研究成果

GLP-1 添加により増加した、上位 150 の遺伝子についてヒートマップを作成した (Fig. 1)。上位 100 までは新規遺伝子のみで、上位 100 - 150 の中に、DNA 結合やタンパク結合、分子機能や脂質輸送を担う遺伝子が含まれていた。同定された遺伝子の総数は約 32000 個で、BMP2 添加により発現量が 2 倍以上に上昇した遺伝子は約 6000 個、GLP-1 添加により発現量が 2 倍以上に上昇した遺伝子は約 4000 個であった。BMP-2 および GLP-1 添加に共通して増加した遺伝子は約 2500 個で、そのうち新規の遺伝子は約 1000 個であった。

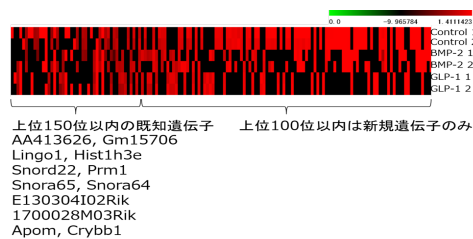


Fig. 1 BMP2、GLP-1 添加により発現が 2 倍以上に上昇した遺伝子 (上位 150)

一方、同定された転写産物の総数は約 70000 個で、BMP-2 添加において発現量が 2 倍以上に上昇した転写産物は約 22000 個、GLP-1 添加において発現量が 2 倍以上に上昇した転写産物は約 19000 個であった。BMP-2 および GLP-1 添加に共通して増加した転写産物は約 12000 個であり、新規の転写産物は約 9000 個であった。GLP-1 添加により 2 倍以上に増加した遺伝子群について、DAVID を用いてパスウェイ解析を行った。calcium signaling pathway で、赤い星印が GLP-1 添加により増加した遺伝子が含まれる位置で (Fig.2)、2 型糖尿病の pathway に関しても、GLP-1 添加により増加した遺伝子群の関与が認められた。

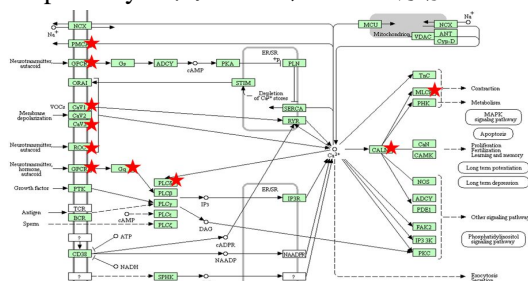


Fig.2 GLP-1 添加により増加した遺伝子が関与する pathway (Calcium signaling pathway)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Beauboeuf R, *Watari I, Saito E, Jui-Chin H, Kubono-Mizumachi M, Ono T. Alterations in the gustatory papillae after anterior bite plate insertion in growing rats. J Orthod Sci. 20;8:4 eCollection 2019.
2. Ren E, *Watari I, Jui-Chin H, Mizumachi-Kubono M, Podyma-Inoue KA, Narukawa M, Misaka T, Watabe T, Ono T. Unilateral nasal obstruction alters sweet taste preference and sweet taste receptors in rat circumvallate papillae. Acta Histochem. 121(2):135-142. 2019
3. Abbassy MA, Watari I, Barkry AS, Ono T, Hassan AH. Calcitonin and vitamin D3 have high therapeutic potential for improving diabetic mandibular growth. Int J Oral Sci 2016;8:39-44.

〔学会発表〕(計1件)

1. 若杉絵美奈、渡一平、井上カタジナアンナ、水町-窪野真理子、小野卓史. 次世代シーケエンサーを用いたマウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 における GLP-1 関与遺伝子の解析 第76回日本矯正歯科学会大会, 札幌, 2017年10月 講演

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/dent/ort1/ort1-J.htm>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 渡部徹郎

ローマ字氏名: WATABE Tetsurou

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 医歯学総合研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00334235

研究分担者氏名: 井上カタジナアンナ

ローマ字氏名: PODYME-INOUE K.A.

所属機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 医歯学総合研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 90302877

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。